

29. 3. 2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

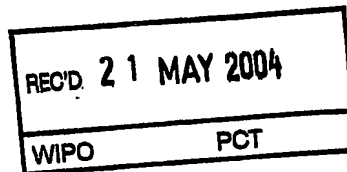
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 3 月 2 8 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 0 9 1 3 7 3
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 0 9 1 3 7 3]

出 願 人 国立身体障害者リハビリテーションセンター総長
Applicant(s): 日立計測器サービス株式会社
 加藤 誠志

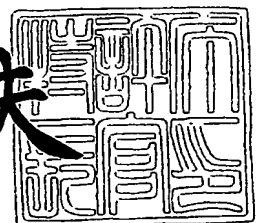


**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 4 月 2 8 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 NP03032-YS

【提出日】 平成15年 3月28日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/10

【発明の名称】 c D N A 合成方法

【請求項の数】 21

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県相模原市若松 3 - 4 6 - 5 0

 【氏名】 加藤 誠志

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県土浦市湖北 2 - 9 - 1
 エスバイエル土浦 7 1 5

 【氏名】 木村 知子

【発明者】

 【住所又は居所】 埼玉県川越市仙波町 3 - 2 - 1
 ホワイトハイム静和 1 0 3

 【氏名】 大床 国世

【特許出願人】

 【識別番号】 391034994

 【氏名又は名称】 国立身体障害者リハビリテーションセンター総長

【特許出願人】

 【識別番号】 300050367

 【氏名又は名称】 日立計測器サービス株式会社

【特許出願人】

 【識別番号】 597115358

 【氏名又は名称】 加藤 誠志

【代理人】

【識別番号】 100093230

【弁理士】

【氏名又は名称】 西澤 利夫

【電話番号】 03-5454-7191

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 009911

【納付金額】 12,600円

【その他】 国等以外の全ての者の持分の割合 60/100

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 cDNA合成方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 mRNAのキャップ構造に隣接するヌクレオチドからの連続配列を有するcDNAを合成する方法であって、

- (i) キャップ構造を有するmRNAを含むRNA混合物に、プライマーオリゴヌクレオチド(P1)をアニールする工程、
 - (ii) プライマーオリゴヌクレオチド(P1)から逆転写酵素により第一鎖cDNAを合成してmRNA/cDNAヘテロデュプレックスを調製する工程、および
 - (iii) mRNA/cDNAヘテロデュプレックスのcDNAの3'端側に、リガーゼを用いてリンカーヌクレオチド(L1)を連結する工程、
- を含むことを特徴とする方法。

【請求項2】 プライマーオリゴヌクレオチド(P1)が3'端にプライマー配列が突出している二本鎖プライマーオリゴヌクレオチド(DP1)である請求項1の方法。

【請求項3】 キャップ構造を有するmRNAが細胞抽出物中に含まれている請求項1の方法。

【請求項4】 キャップ構造を有するmRNAがインビトロ転写によって合成されたものである請求項1の方法。

【請求項5】 プライマーオリゴヌクレオチド(P1)のプライマー配列が、キャップ構造を有するmRNAの部分配列に相補的な配列を含む請求項1または2の方法。

【請求項6】 プライマーオリゴヌクレオチド(P1)のプライマー配列が、キャップ構造を有するmRNAのポリ(A)配列に相補的なオリゴdTを含む請求項1または2の方法。

【請求項7】 リガーゼがT4 RNAリガーゼである請求項1の方法。

【請求項8】 さらに以下の工程：

- (iv-a) mRNA/cDNAヘテロデュプレックスのRNA鎖をDNA鎖に置換して第二鎖cDNAを合成する工程、

を含む請求項 1 から 7 のいずれかの方法。

【請求項 9】 リンカーオリゴヌクレオチド(L1)に対して相補的な配列を含むプライマーオリゴヌクレオチド(P2)と、プライマーオリゴヌクレオチド(P1)あるいは第一鎖cDNAに対して相補的な配列を含むプライマーオリゴヌクレオチド(P3)を用いたPCR反応によって第二鎖cDNAを合成する請求項 8 の方法。

【請求項 10】 プライマーオリゴヌクレオチド(P2)の3'端がGである請求項 9 の方法。

【請求項 11】 さらに以下の工程：

(v-a) 第一鎖cDNAと第二鎖cDNAとからなる二本鎖cDNAを環状ベクターDNAの一部とする工程、

を含む請求項 8 の方法。

【請求項 12】 さらに以下の工程：

(iv-b) 一端にプライマーオリゴヌクレオチド(P1)を、他端にリンカーオリゴヌクレオチド(L1)を有するmRNA/cDNAヘテロデュプレックスを環状ベクターDNAの一部とする工程、

を含む請求項 1 から 7 のいずれかの方法。

【請求項 13】 リンカーオリゴヌクレオチド(L1)が二本鎖リンカーオリゴヌクレオチド(DL1)である請求項 12 の方法。

【請求項 14】 プライマーオリゴヌクレオチド(P1)と二本鎖リンカーオリゴヌクレオチド(DL1)が連続している請求項 13 の方法。

【請求項 15】 二本鎖リンカーオリゴヌクレオチド(DL1)が複製オリジンとcDNA発現用プロモーターを含んでいる請求項 13 または 14 の方法。

【請求項 16】 さらに以下の工程：

(v-b) 環状ベクターDNAの一部としたmRNA/cDNAヘテロデュプレックスのRNA鎖をDNA鎖に置換して二本鎖cDNAを合成する工程、

を含む請求項 13 の方法。

【請求項 17】 請求項 11 または請求項 16 の方法によって合成された二本鎖cDNAを含むクローンの集団であって、5'端にヌクレオチド(T)_nG (n=0~10)を有し、これに連続してmRNAのキャップ構造に隣接するヌクレオチドからの連

連続配列を有するcDNAのクローンを60%以上含むことを特徴とするcDNAライブラリー。

【請求項18】 請求項18のcDNAライブラリーのクローンから、mRNAのキャップ構造に隣接するヌクレオチドからの連続配列を有するcDNAのクローンを選択する方法であって、5'端ヌクレオチドが $T_n G$ ($n=0\sim 10$)であるcDNAを含むクローンを目的クローンとする方法。

【請求項19】 プライマーオリゴヌクレオチド(P1)と二本鎖リンカーオリゴヌクレオチド(DL1)が連続している二本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項20】 二本鎖リンカーオリゴヌクレオチド(DL1)が複製オリジンとcDNA発現用プロモーターを含んでいる請求項19の二本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項21】 配列番号1の塩基配列を有するpGCAP1由来のベクタープライマーである請求項20の二本鎖オリゴヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、cDNAの合成方法に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、mRNAのキャップ構造に隣接するヌクレオチドからの連続配列を有するcDNAを、簡便かつ高効率で合成する新しい方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

ゲノムプロジェクトによって、ヒト、マウス、イネ、線虫、酵母など様々な生物の全遺伝子情報を網羅するゲノムDNA（染色体DNA）の全長配列がほぼ決定された。これらのゲノムの全長配列から期待されることは、遺伝子がコードしている蛋白質の一次構造に関する情報と、遺伝子の発現を調節している発現制御領域（プロモーター、エンハンサー、サプレッサー等）に関する情報である。これら二つの情報をゲノム配列から抽出するためには、染色体DNAの遺伝子領域から転写されるmRNAの配列情報が必須であるが、このmRNAの配列情報を解析するためには、mRNAに相補的なDNA（complementary DNA：cDNA）が通常用いられている。特に

、前記二つの情報を得るためには、遺伝子転写領域から正確に転写され、かつ、蛋白質コード領域の全てを含むmRNAから合成されたcDNA（完全長cDNA）を取得する必要がある。

【0003】

通常、完全長cDNAに対しては、二つの条件が設定されている。一つは、ゲノムDNAの転写開始点から始まる配列を有することである。転写開始点から正しく転写されたmRNAの5'端には「キャップ構造」が付加される。このキャップ構造は、7-メチルグアノシン (m^7G) が転写開始点ヌクレオチドに5'-5'三リン酸橋を介して結合したものであり、このキャップ構造を有するmRNAに対して相補的なcDNAは完全長cDNAの一つの条件を満たすことになる。もう一つの指標は、mRNAにおける「ポリ(A)テール」の存在である。このポリ(A)テールは、ゲノムDNAから転写されたmRNAの3'端に核内で付加される数十から200個のアデニン(A)連続配列である。従って、5'側にキャップ構造を有し、3'側にポリ(A)テールを有するmRNAを鋳型として正確に合成されたcDNAは、完全長cDNAの二つの条件（転写開始点から始まり、蛋白質コード領域の全てをカバーする）を満たすことになる。

【0004】

cDNAは、mRNAを鋳型として逆転写反応により合成することができるが、染色体DNAから転写されたmRNAは細胞内で、あるいは細胞外への抽出およびDNA鎖への合成過程で様々な分解反応に曝されるため、完全長cDNAの合成は容易ではない。また、mRNAを鋳型とする逆転写反応は、mRNAの3'側にプライマーオリゴヌクレオチドをアニールさせ、このプライマーからmRNAの5'方向へDNA鎖（第一鎖cDNA）を合成する。従って、例えば、ポリ(A)テールにプライマー（オリゴdT）をアニールすれば、ポリ(A)テールをカバーするcDNAは比較的容易に得ることができる。しかしながら、この方法は、プライマーからキャップ構造までの完全長cDNA合成を保証しない。DNA鎖の合成反応が途中で中断することが頻繁に生じるためである。事実、現在までにEST（Expression Sequence Tag）として膨大な数の配列情報が報告されているが、これらはDNA合成反応が中断された不完全cDNAに由来するものが大半である。

【0005】

そこで、完全長cDNAを合成するために、mRNAの5'端に存在するキャップ構造を標的とする方法が数多く提案されている。これらの方法は、原理に基づき次の4つに大きく分類することができる。

(1) テーリング法

キャップ部位まで伸長した第一鎖cDNAに、末端転移酵素によってホモオリゴマーテールを付加する方法であり、Okayama-Berg法（非特許文献1）やPruitt法（非特許文献2）がこれに含まれる。分解されたmRNAから合成されたcDNAも含まれるため、完全長cDNAの含有率は鋳型として用いるmRNAの質に依存する。付加したテールの数を厳密に制御することができないため、数が多すぎると塩基配列の解析が困難になる等の問題点を有している。

【0006】

逆転写酵素の末端転移酵素活性によって第一鎖cDNAの3'端に付加したdCテールを利用する鋳型スイッチ法（特許文献1）もこのテーリング法に含まれる。この際、付加されるdCの数は、3～5個と記載されている（非特許文献3）。

(2) リンカーライゲーション法

第一鎖cDNAを合成後、アルカリ処理やRNaseH処理によってmRNAを分解除去した後、一本鎖cDNAの3'端に、配列既知の一本鎖オリゴヌクレオチドリンカーをT4 RNAリガーゼを用いて連結する方法である（非特許文献4）。一本鎖DNAを基質とする場合のT4 RNAリガーゼの反応効率が悪いことや、一本鎖cDNAが二次構造を形成するため高品質のcDNAライブラリーを作製するには向かない。

(3) オリゴキャッピング法

キャップ構造をオリゴマーで置換する方法である。オリゴマーとして、RNAオリゴマー（非特許文献5）やDNA-RNAキメラオリゴマーを用いる方法（例えば、この出願の発明者らによる特許文献1、非特許文献6）が報告されている。原理的には、完全長cDNAのみが合成されるはずであるが、約5-10 μ gという多量のポリ(A)+RNAを必要とし、mRNAを処理する工程が多く、この段階で分解されたmRNAから合成されたcDNAが含まれる場合もある。mRNAの分解を抑えるために、全RNAを出発材料とすることにより、完全長率を90%以上とした例もあるが、工程数は変わらない（特許文献2）。

【0007】

過ヨウ素酸酸化反応によってキャップ構造の糖を開裂した後、合成オリゴマーを付加する方法（特許文献3）もこの方法に含まれる。

(4) キャップトラッピング法

キャップ構造を有するmRNAを選別して鋳型とする方法であり、抗キャップ抗体によって選別したmRNAを鋳型にする方法（非特許文献7）や、過ヨウ素酸酸化反応によってキャップ構造の糖を開裂した後、ビオチンを付加し、アビジン固定化単体で選別したmRNAを鋳型として用いる方法（非特許文献8）などがある。

【0008】

【特許文献1】

米国特許第5,962,272号

【特許文献2】

特許3337748号

【特許文献3】

国際公開第01/04286号パンフレット

【特許文献4】

米国特許第6,022,715号

【非特許文献1】

Okayama, H. and Berg, P. Mol. Cell. Biol. 2:161-170, 1982

【非特許文献2】

Pruitt, S.C., Gene 66:121-134, 1988.

【非特許文献3】

CLONTECHniques, July 1997, p.26

【非特許文献4】

Edwards, J., Delort, J., and Mallet, J. Nucleic Acids Res. 19:5227-5232, 1991

【非特許文献5】

Maruyama, K and Sugano, S. Gene 138:171-174, 1994

【非特許文献6】

Kato et al., Gene 150:243-250, 1994

【非特許文献 7】

Edery, I, Chu, L.L., Sonenberg, N., and Pelletier, J. Mol. Cell. Biol. 15:3363-3371, 1995

【非特許文献 8】

Carninci et al., Genomics 37:327-336, 1996

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

前記のいずれの従来方法によっても完全長cDNAの合成は可能である。しかしながら、合成されたcDNAのうち、完全長cDNAが占める割合は多くても75%程度である。このため、合成されたcDNAがキャップ構造を有する完全長mRNAに由来するものであるか否かを判定する必要がある。一般的には、同じ5'端配列を有するクローンが複数個存在すれば、それらは完全長mRNAに由来するものである可能性は高いが、断定はできない。とりわけ、複数の転写開始点を有する遺伝子の場合には、完全長mRNAに由来するcDNAクローンであるか、5'端が欠失した分解産物由来のクローンであるかを決定することは極めて困難である。

【0010】

従って、完全長cDNAを高い割合で合成し、かつ転写開始点から始まる配列を有していることを識別することのできるcDNA合成方法が求められている。

【0011】

また、前記のいずれの従来方法も、多くの工程を必要とするという問題点を有している。例えば、特許文献1のオリゴキャッピング法は、確実にキャップ部位からの塩基配列を含むcDNAを合成可能であるという点において優れた方法ではあるが、cDNAの合成までに8工程を要する。工程の増大は、cDNAの合成収率の低下や、時間や労力、コストの増加といった問題を引き起こす。

【0012】

従って、少ない工程で完全長cDNAの合成を可能とする方法が求められていた。

【0013】

この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、少な

い工程で、完全長cDNAを効率的に合成する方法を提供することを課題としている。

【0014】

【課題を解決するための手段】

前記の課題を解決するための第1の発明は、mRNAのキャップ構造に隣接するヌクレオチドからの連続配列を有するcDNAを合成する方法であって、

- (i) キャップ構造を有するmRNAを含むRNA混合物に、プライマーオリゴヌクレオチド(P1)をアニールする工程、
 - (ii) プライマーオリゴヌクレオチド(P1)から逆転写酵素により第一鎖cDNAを合成してmRNA/cDNAヘテロデュプレックスを調製する工程、および
 - (iii) mRNA/cDNAヘテロデュプレックスのcDNAの3'端側に、リガーゼを用いてリンカーヌクレオチド(L1)を連結する工程、
- を含むことを特徴とする方法である。

【0015】

この第1発明の方法におけるプライマーオリゴヌクレオチド(P1) (以下、「プライマー」または「プライマー (P1)」と記載することがある) は、具体的には一本鎖プライマー(SP1)または二本鎖プライマー (DP1) であり、リンカーオリゴヌクレオチド(L1) (以下、「リンカー」または「リンカー(L1)」と記載することがある) は、具体的には一本鎖リンカー(SL1)または二本鎖リンカー (DL1) である。そして、二本鎖プライマー(DP1)の場合には、3'端にプライマー配列が突出しているものを好ましい態様としている。

【0016】

この第1発明の方法においては、また、キャップ構造を有するmRNAが細胞抽出物中に含まれていること、またはキャップ構造を有するmRNAがインビトロ転写によって合成されたものであることをそれぞれ好ましい態様としている。

【0017】

またこの第1発明の方法においては、プライマーオリゴヌクレオチド(P1)のプライマー配列が、キャップ構造を有するmRNAの部分配列に相補的な配列、またはキャップ構造を有するmRNAのポリ(A)配列に相補的なオリゴdTを含むことをそれ

ぞれ好ましい態様としている。

【0018】

さらにこの第1発明の方法においては、リガーゼがT4 RNAリガーゼであることを好ましい態様としている。

【0019】

この第1発明の方法は、さらに以下の工程：

(iv-a) mRNA/cDNAヘテロデュプレックスのRNA鎖をDNA鎖に置換して第二鎖cDNAを合成する工程、
を含むことを第1の発展形態としている。

【0020】

またこの第1の発展形態を含む第1発明の方法においては、リンカーオリゴヌクレオチド(L1)に対して相補的な配列を含むプライマーオリゴヌクレオチド(P2)と、プライマーオリゴヌクレオチド(P1)あるいは第一鎖cDNAに対して相補的な配列を含むプライマーオリゴヌクレオチド(P3)を用いたPCR反応によって第二鎖cDNAを合成すること、そしてこの場合のプライマーオリゴヌクレオチド(P2)の3'端がGであることをそれぞれ好ましい態様としている。

【0021】

この第1発明の前記第1形態においては、さらに以下の工程：

(v-a) 第一鎖cDNAと第二鎖cDNAとからなる二本鎖cDNAを環状ベクターDNAの一部とする工程、
を含むことを別の発展形態としている。この工程によって、合成された二本鎖cDNAを含むベクタークロンが得られる。

【0022】

第1発明方法の第2の発展形態は、さらに以下の工程：

(iv-b) 一端にプライマーオリゴヌクレオチド(P1)を、他端にリンカーオリゴヌクレオチド(L1)を有するmRNA/cDNAヘテロデュプレックスを環状ベクターDNAの一部とする工程、
を含むことである。

【0023】

この第2の発展形態においては、リンカーオリゴヌクレオチド(L1)が二本鎖リンカーオリゴヌクレオチド(DL1)であること、そしてプライマーオリゴヌクレオチド(P1)と二本鎖リンカーオリゴヌクレオチド(DL1)が連続していることを好ましい態様としている。また二本鎖リンカーオリゴヌクレオチド(DL1)が複製オリジンとcDNA発現用プロモーターを含んでいることを好ましい態様としてもいる。

【0024】

第1発明方法の第2の発展形態はさらに、以下の工程：

(v-b) 環状ベクターDNAの一部としたmRNA/cDNAヘテロデュプレックスのRNA鎖をDNA鎖に置換して二本鎖cDNAを合成する工程、
を含むことを好ましい発展形態としている。この工程によってもまた、合成された二本鎖cDNAを含むベクタークロンが得られる。

【0025】

この出願の第3の発明は、前記第1発明の方法によって最終的に合成された二本鎖cDNAを含むクロンの集団であって、5'端にヌクレオチド(T)_nG (n=0~10)を有し、これに連続してmRNAのキャップ構造に隣接するヌクレオチドからの連続配列を有するcDNAのクロンを60%以上含むことを特徴とするcDNAライブラリーである。

【0026】

この出願の第4の発明は、前記第3発明のcDNAライブラリーのクロンから、mRNAのキャップ構造に隣接するヌクレオチドからの連続配列を有するcDNAのクロンを選択する方法であって、5'端ヌクレオチドがT_nG (n=0~10)であるcDNAを含むクロンを目的クロンとする方法である。

【0027】

この出願の第5の発明は、プライマーオリゴヌクレオチド(P1)と二本鎖リンカーオリゴヌクレオチド(DL1)が連続している二本鎖オリゴヌクレオチドである。

【0028】

この第5発明の二本鎖オリゴヌクレオチドにおいては、二本鎖リンカーオリゴ

ヌクレオチド(DL1)が複製オリジンとcDNA発現用プロモーターを含んでいることを好ましい態様としている。またその具体例は、配列番号1の塩基配列を有するpGCAP1由来のベクタープライマーである。

【0029】

すなわちこの発明は、少なくとも

- (i)mRNAへのプライマーオリゴヌクレオチドのアニール、
 - (ii)第一鎖cDNAの合成によるmRNA/cDNAヘテロデュプレックスの調製、および
 - (iii)mRNA/cDNAヘテロデュプレックスの第一鎖cDNA3'端へのリンカーオリゴヌクレオチドの連結、
- という三段階の工程によって、mRNAのキャップ構造に連続する塩基配列を有するcDNAを高効率で合成する方法である。すなわちこの発明の方法においては、キャップ構造を有するmRNAが鋳型となる場合には、前記工程(ii)によって、キャップ構造の塩基が「G」の場合には「C」[または5'-C(A)_n-3' (n=1-10)]が第一鎖cDNAの3'端に付加されることを見いだして完成された。キャップ構造の塩基が「A」の場合には「T」[または5'-T(A)_n-3' (n=1-10)]が第一鎖cDNAの3'端に付加されることから、付加されるヌクレオチドはキャップ構造の塩基に相補的な塩基を有するものであることが示された。

【0030】

なお、鋳型スイッチ法では3~5個のdCが付加されると記載されているが(非特許文献3)、この発明においては、そのような複数個のdC付加は認められなかった。

【0031】

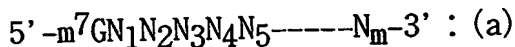
なお、この発明において、「オリゴヌクレオチド」とは、プリンまたはピリミジンが糖にβ-N-グリコシド結合したヌクレオシドのリン酸エステル(ATP、GTP、CTP、UTP;またはdATP、dGTP、dCTP、dTTP)が2個以上結合した分子を言う。以下の説明において、前記のヌクレオチドはそれぞれ単に「A」、「G」、「C」、「TまたはU」と記載することがある。また「相補的」とは、前記ヌクレオチドの[A]と「TまたはU」、「G」と「C」との水素結合による対合を意味する。

【0032】

また、「プライマーオリゴヌクレオチド」とは、鋳型mRNA配列に相補的な塩基配列を有し、その3'端からヌクレオチド鎖を合成するために使用するオリゴヌクレオチドを言う。さらに「リンカーオリゴヌクレオチド」とは、プライマーオリゴヌクレオチドから合成された第一鎖cDNAの3'端に連結するオリゴヌクレオチドを言う。

【0033】

またさらに、この発明において「キャップ構造を有するmRNA」は、ゲノムDNAからの転写産物mRNAの5'端に、メチル化されたグアニン(G)を有するグアノシンが5'-5'三リン酸結合(Gp5'-5'pp)した分子であり、例えばGの第7位がメチル化されたキャップ構造の場合には以下の構造:

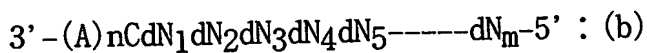


(なお、NはA、G、CまたはU、mは50以上の正数)

を有している。

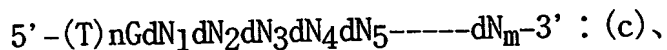
【0034】

この発明における「mRNAのキャップ構造に隣接するヌクレオチドからの連続配列を有するcDNA」とは、前記のmRNA構造(a)における $N_1 \sim N_m$ 配列に相補的なcDNAの3'端に $5' - C(A)_n - 3'$ ($n=0-10$) が付加したcDNA (第一鎖cDNA) :



(なお、dNはdA、dG、dCまたはdT)

と、このcDNA(b)に対してさらに相補的なcDNA (第二鎖cDNA) :



およびcDNA(b)/(c)のデュプレックス (二本鎖cDNA) を全て意味する。ただし、単に「cDNA」と言う場合には二本鎖cDNAを言い、その塩基配列について言及する場合には、前記構造(c)の第二鎖cDNAのものを言う。

【0035】

また、前記のmRNA構造(a)における N_1 は、転写開始点のヌクレオチドであることから、「mRNAのキャップ構造に隣接するヌクレオチドからの連続配列を有するcDNA」とは、「転写開始点ヌクレオチドからの連続配列を有するcDNA」と定義することもできる。

【0036】

以下の説明においては、「mRNAのキャップ構造に隣接するヌクレオチド（転写開始点ヌクレオチド）からの連続配列を有するcDNA」を、「キャップ連続cDNA」と記載することがある。また、このキャップ連続cDNAのうち、特にmRNAのポリ(A)配列までを含むものを「完全長cDNA」と記載することがある。さらに、キャップ構造に隣接するヌクレオチド（前記の構造(b)または(c)における少なくともdN₁)を含まないcDNAを「キャップ非連続cDNA」と記載することがある。またさらに、「キャップ構造を有するmRNA」を「キャップ(+)mRNA」、「キャップ構造を持たないmRNA」を「キャップ(-)mRNA」、キャップ(+)mRNAからキャップ構造を除去したものを「脱キャップmRNA」と記載することがある。

【0037】

この発明におけるその他の用語や概念は、発明の実施形態の説明や実施例において詳しく規定する。またこの発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。例えば、この発明の遺伝子工学および分子生物学的技術はSambrook and Maniatis, in Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y, 1995等に記載されている。

【0038】

以下、各発明について、実施形態を詳しく説明する。

【0039】

【発明の実施の形態】

第1の発明は、キャップ連続cDNA（第一鎖cDNA）を合成する方法であって、以下の工程(i)、(ii)および(iii)を必須として含むことを特徴としている（図1参照）。

工程(i)：キャップ構造を有するmRNAを含むRNA混合物に、プライマーオリゴヌクレオチド(P1)をアニールする。

工程(ii)：プライマーオリゴヌクレオチド(P1)から逆転写酵素により第一鎖cDNA

を合成して mRNA/cDNA ヘテロデュプレックスを調製する。

工程(iii): mRNA/cDNA ヘテロデュプレックスの cDNA の 3' 端側に、リガーゼを用いてリンカーヌクレオチド(L1)を連結する。

【0040】

工程(i)において、「キャップ付加 mRNA を含む RNA 混合物」は、実質的にキャップ付加 mRNA のみからなるものであってもよく、その他に、例えば「キャップ(-) mRNA」および/または「他の RNA 分子 (例えば rRNA、tRNA 等)」を含んでいてもよい。このような RNA 混合物は、単細胞真核生物由来のものであってもよく、多細胞真核細胞由来のものであってもよい。またこの RNA 混合物は、DNA 配列を鋳型としてインビトロ転写により合成されたものでもよく、あるいは細胞抽出物としての全 RNA であってもよい。この工程(i)において、RNA 混合物は、例えば全 RNA の場合は $1\mu\text{g}$ 以下でも cDNA の合成は可能であるが、好ましくは $1\mu\text{g}$ 以上を使用する。細胞から抽出される全 RNA の場合、mRNA は 2-3% であり、キャップ(+) mRNA はさらに少量であるが、この発明の方法ではこのような少量の mRNA からキャップ連続 cDNA や完全長 cDNA を合成することが可能である。

【0041】

工程(i)で使用する「プライマー(P1)」は、少なくとも 3' 側にプライマー配列を備えた一本鎖プライマー (SP1)、またはその 3' 突出末端として「プライマー配列」を備えている二本鎖プライマー (DP1) である。この場合のプライマー配列は、例えば、対象となるキャップ付加 mRNA の部分配列情報が公知の場合は、この公知配列に基づいて公知の化学合成法による作製することができる。例えば公知の EST (Expression Sequence Tag) 配列は cDNA の 3' 側部分配列がほとんどであるが、これらの配列に基づいて作製したプライマー配列を用いることによって、その EST 配列より 5' 側のキャップ連続 cDNA を取得することができる。一方、mRNA の塩基配列が未知の場合は、不特定の配列にアニールすることのできるランダムプライマーを使用することができる。このようなランダムプライマーとしては、例えば、数塩基～数十塩基程度の任意の塩基配列からなる一本鎖 DNA 配列を使用することができる。また、mRNA のポリ (A) 配列に相補的なオリゴ dT を含むプライマーを使用することもできる。オリゴ dT を構成する連続した dT の数は、一本鎖プ

ライマー (SP1) を用いる場合は15~40個、二本鎖プライマー (DP1) を用いる場合は30~100個が好ましく用いられる。このようなオリゴdTプライマーの使用によって、ポリ (A) 部位までを含むキャップ連続cDNA (完全長cDNA) を取得することができる。一方、このようなプライマー配列の他端部は、特に制限はなく、任意の一本鎖または二本鎖オリゴヌクレオチドとすることができるが、後の工程において環状ベクターDNAへの挿入連結を容易とするように、ベクターDNAのクローニングサイトへの連結末端を端部に備えるようにすることが好ましい。

【0042】

工程(ii)においては、mRNAにアニールしたプライマー(P1)に逆転写酵素を作用させ、プライマー(P1)の3'端からmRNAの5'方向に相補的なcDNA鎖を合成する。この工程により、キャップ(+)mRNAに相補的で、かつ3'端にCまたは5'-C(A)_n-3'を付加したキャップ連続cDNAと、キャップ(-)mRNAに由来するキャップ非連続cDNAのそれぞれを有するmRNA/cDNAヘテロデュプレックスが形成される。

【0043】

第1発明の工程(iii)において使用するリンカー(L1)は、2塩基以上の配列からなる一本鎖または二本鎖DNA断片 (図2) であって、その塩基配列には特段の制限はない。ただし、第一鎖cDNAの3'端に連結するリンカー5'端はリン酸化されている必要がある。一本鎖リンカー(SL1)の場合は、3'端の水酸基が除去されているか (例えば、ジデオキシヌクレオチドを付加する)、アミノ基などにより置換されていることが好ましい。さらにまた、二本鎖リンカー(DL1)の場合には、その両端は、それぞれ平滑末端であってもよい (例えば図1)。また、二本鎖リンカー (DL1) の連結端は突出末端であってもよい (図2B、C)。ただし、mRNA/cDNAヘテロデュプレックスとの連結端部とは反対側の端部は、後の工程において環状ベクターDNAへの挿入連結を容易とするように、ベクターDNAのクローニングサイトへの連結末端とすることが好ましい。

【0044】

工程(iii)におけるリガーゼとしては、各種のDNAリガーゼまたはRNAリガーゼを適宜に選択して使用できるが、好ましくはT4 RNAリガーゼを使用する。なお、リンカー (DL1) のライゲーションは、mRNA/cDNAヘテロデュプレックスのキャッ

プ構造を、例えばタバコ酸性ピロホスファターゼを用いて除去してから行ってもよく、あるいはそのキャップ構造を残存させたまま行ってもよい。なお、T4 RNA リガーゼによって、RNAにハイブリダイズさせた2本のオリゴデオキシヌクレオチド同士を連結する方法（米国特許第6,368,801号）が報告されているが、mRNA/cDNAヘテロデュプレックスにリンカーDNAを連結した例はない。

【0045】

以上の方法によって、



からなるキャップ連続cDNA（第一鎖cDNA）が合成される。このようにして得られたキャップ連続cDNAは、例えばその配列解析とゲノム配列との比較によって、遺伝子の転写開始点やその上流の発現制御領域を特定するために情報を提供する。

【0046】

以上の方法により得られたキャップ連続cDNA（第一鎖cDNA）は、第1発明の第1の発展形態（工程(iv-a)）によって二本鎖cDNAへと合成される。この工程(iv-a)は、例えば、RNaseH、大腸菌DNAポリメラーゼI、大腸菌DNAリガーゼ等を作用させてRNA鎖をDNA鎖に置換する方法や、あるいはPCR反応を利用した方法によって行うことができる。PCR法を用いるとcDNAの配列に人工産物である変異が入ることがあるので、大腸菌DNAポリメラーゼIを用いる方法が好ましい。ただし、出発材料であるmRNAの量が少ない場合には、PCR法は二本鎖のキャップ連続cDNAを増幅できるという意味において好ましい方法である。このPCR法の場合には、PCRプライマーとして、前記リンカー(L1)の配列に対応する塩基配列からなる5'側プライマー(P2)と、前記プライマー(P1)のプライマー配列に対応する塩基配列からなる3'側プライマー(P3)を使用する。さらにプライマー(P2)として、その3'端が「G」であるものを用いれば、キャップ連続cDNAを選択的に増幅することができる。

【0047】

以上のとおりにして得られた二本鎖cDNAは、例えば、さらなる工程(v-a)によって環状ベクターDNAに挿入するなどして、配列解析やその発現産物の産生等に使用することができる。

【0048】

第1発明の第2の発展形態（工程(iv-b)）は、例えば工程(i)で使用するプライマー(P1)、好ましくは二本鎖プライマー(DP1)の末端と、工程(iii)で使用するリンカー(L1)、好ましくは二本鎖リンカー(DL1)の末端を、それぞれベクターDNAのクローニングサイトとの連結端とすることによって行うことができる。あるいはまた、さらに好ましい方法としては、二本鎖プライマー(DP1)と二本鎖リンカー(DL1)が連結した直鎖状のオリゴヌクレオチドを使用する。これにより、工程(i)においてプライマー(DP1)をアニールさせ、工程(iii)においてリンカー(DP1)を連結することによって、工程(iv-b)を自動的に完了することができる（図3参照）。このような二本鎖プライマー／リンカーは、例えば、環状ベクターDNAを適当なクローニングサイトで制限切断し、その3'端にmRNAの一部配列に相補的なプライマー配列を連結して3'突出末端とすることによって作製することができる。また、完全長cDNAを合成するためには、3'端にオリゴdT（好ましくは、30～70個）を連結すればよい。3'突出末端としてオリゴdTを有する二本鎖プライマー／リンカーは、例えば完全長cDNAライブラリーを効率良く作製するなどの目的には特に好ましい。さらにまた、リンカー部分に複製オリジンを備えるようにすることも好ましい。複製オリジンとしては、大腸菌などの原核細胞や、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞、植物細胞などの真核細胞内で機能するものが用いられる。これによって、最終的に得られたcDNAベクターをこれらの細胞に導入して、複製することが可能となる。さらに、cDNAをインビトロ転写・翻訳により試験管内で発現させたり、真核細胞内に導入して発現させたりできるように、リンカー部分にプロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位などを備えることも好ましい。

【0049】

このような二本鎖プライマー／リンカー（第5発明）は、適当なベクターDNAを出発材料として適宜にデザインしてもよく、あるいは公知のもの（例えば、pKA1ベクタープライマー（一端に約60個の3'突出末端dTテールを有し、もう一端がEcoRV平滑末端 [Kato et al., Gene 150:243-250, 1994]）等を使用することもできる。この発明において作製したpGCAP1ベクタープライマーを用いると、完全長

cDNAライブラリーを効率良く作製したり、ライブラリーの中から「キャップ連続cDNA」を効率良く選別できる。たとえば、pGCAP1ベクタープライマーの一方の末端には、AflIII部位(CTTAAG)が設けてあるが、このAflIII 5' 突出末端(…CTTAA)に第一鎖cDNAの3' 端が連結すると、「キャップ連続cDNA」の場合、5' 突出末端に「G」が付加して、…CTTAAG…となり、AflIIIの切断認識配列が復活する。したがって、「キャップ連続cDNA」クローンは、AflIIIによって切断可能となる。このことを利用すれば、AflIII消化によってキャップ連続cDNAクローンかどうかを判定することもできる。他にも「G」付加によって切断認識配列が復活するMunI(CTTAAG)、XhoI(CTCGAG)等も利用できる。

【0050】

以上のとおりの工程(iv-b)によって環状ベクターDNAの一部としたmRNA/cDNAヘテロデュプレックスに対しては、工程(v-b)においてそのRNA鎖をDNA鎖に置換することによって、二本鎖cDNAをインサートするcDNAベクタークローンが得られる。RNA鎖からDNA鎖の置換は、例えば、RNaseH、大腸菌DNAポリメラーゼI、大腸菌DNAリガーゼ等を作用させてRNA鎖をDNA鎖に置換する公知の方法によって行うことができる。

【0051】

この出願の第3発明は、前記第1発明または第2発明の方法によって最終的に作製されたcDNAベクターの集団からなる「cDNAライブラリー」である。このcDNAライブラリーは、後記実施例にも示したように、キャップ連続cDNAを含むクローンを60%以上、好ましくは75%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上という極めて高い確率で保有することを特徴としている。

【0052】

従って、この第3発明のcDNAライブラリーは、そのほとんどのクローンがキャップ連続cDNAであるため、キャップ連続cDNAを特に選択しない場合であっても、高い確率でキャップ連続cDNAを単離して解析することができる。ただし、正確を期するためには、この出願の第4発明の方法によって、キャップ連続cDNAを正しく選択することができる。すなわち、前記第1発明および第2発明の方法によって合成されたキャップ連続cDNAは、その5' 端に「(T)_nG」を有することを特徴とし

ているため、全塩基配列を調べる必要はなく、この「(T)nG」の存否を指標としてキャップ連続cDNAを特定することができる。「(T)nG」の存在は、公知の塩基配列決定法等により簡便に行うことができる。なお、90%以上は「G」から始まるので、実際的には「G」の存否を指標とすればよい。

【0053】

【実施例】

次に実施例により発明を具体的に説明するが、この発明はこれらの例に限されるものではない。なおDNAの組換えに関する基本的な操作および酵素反応は、文献 (Sambrook and Maniatis, in Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989) に従った。制限酵素および各種修飾酵素は特に記載の無い場合には宝酒造社製のものを用いた。各酵素反応の緩衝液組成、並びに反応条件は付属の説明書に従った。

実施例 1: キャップアナログ付加RNAを用いたcDNA合成

(1) キャップアナログ付加RNAの調製

ヒト延長因子-1 α (EF-1 α) の完全長cDNAクローンpHP00155(非特許文献6)をNotI消化により直鎖状にした後、これを鋳型にしてインビトロ転写キット (Ambion社製) を用いてmRNAを調製した。反応液にキャップアナログとして、m⁷G(5')pppG(5)あるいはA(5')pppG(5) (いずれもAmbion社製) を添加することにより、「m⁷G」あるいは「A」をキャップ構造とするモデルmRNAを得た。また、キャップアナログ無添加によって、キャップ構造を持たないモデルmRNAを得た。インビトロ転写産物の5'端の塩基配列は、ベクター由来の配列 (5'-GGGAATTCGAGGA-3') の下流にEF-1 α の5'端配列 (5'-CTTTTTTTCGCAA...) が続いている。

(2) 第一鎖cDNA合成

上記で調製したモデルmRNA 0.3 μ gとpKA1ベクタープライマー (一端に約60個の3'突出末端dTテールを有し、もう一端がEcoRV平滑末端) (非特許文献6) 0.3 μ gを反応液 (50mM Tris-HCl, pH8.3, 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 5mM DTT, 1.25mM dNTP) に混合し、モデルmRNAとベクタープライマーとをアニールさせたのち、逆転写酵素Superscript II (インビトロジェン社製) 200Uとリボヌクレアーゼインヒビター40U (宝酒造社製) を添加して、42℃1時間反応させ、モデルmRNAに相補

的な第一鎖cDNAを合成した。反応液をフェノール抽出した後、エタノール沈澱により、キャップ(+)mRNA/cDNAヘテロデュプレックスを回収し、水20 μ lに溶解した。

(3) 脱キャップ反応

キャップ(+)mRNA/cDNAヘテロデュプレックス溶液20 μ lを反応液 (50mM酢酸ナトリウム, pH5.5, 5mM EDTA, 10mM 2-メルカプトエタノール) に混合し、10Uのタバコ酸性ピロホスファターゼ (日本ジーン社製) を添加し、37℃30分間反応させ、mRNAのキャップ構造を除去した。反応液をフェノール抽出した後、エタノール沈澱により、脱キャップmRNA/cDNAヘテロデュプレックスを回収し、水20 μ lに溶解した。

(4) セルフライゲーション

前記(2)で得たキャップ(+)mRNA/cDNAヘテロデュプレックス溶液、および前記(3)で得た脱キャップmRNA/cDNAヘテロデュプレックス溶液のそれぞれ20 μ lを反応液 (50mM Tris-HCl, pH7.5, 5mM MgCl₂, 10mM 2-メルカプトエタノール, 0.5mM ATP, 2mM DTT) に混合し、120UのT4 RNAリガーゼ (宝酒造社製) を添加し、20℃16時間反応させ、mRNA/cDNAヘテロデュプレックスの末端とベクタープライマーのEcoRV末端とをライゲーションさせて環状とした (セルフライゲーション反応)。反応液をフェノール抽出した後、エタノール沈澱により、セルフライゲーション産物を回収し、水20 μ lに溶解した。

(5) RNA鎖からDNA鎖への置換

セルフライゲーション産物溶液20 μ lを反応液 (20mM Tris-HCl, pH7.5, 4mM MgCl₂, 10mM (NH₄)₂SO₄, 100mM KCl, 50 μ g/ml BSA, 0.1mM dNTP) に混合し、0.3UのRNaseH (宝酒造社製)、4UのE.coli DNAポリメラーゼI (宝酒造社製)、60UのE.coli DNAリガーゼ (宝酒造社製) を添加し、12℃5時間反応させ、RNA鎖をDNA鎖で置換して第二鎖cDNAを合成し、cDNA/cDNAヘテロデュプレックスをインサートとするベクター (cDNAベクター) を得た。反応液をフェノール抽出した後、エタノール沈澱により、cDNAベクターを回収し、TE 40 μ lに溶解した。

(6) 大腸菌の形質転換

cDNAベクター溶液1 μ lをDH12Sコンピテント細胞 (インビトロジェン社製) 20

μ lと混合し、エレクトロポレーション法により形質転換を行なった。エレクトロポレーションは、MicroPulser (バイオラッド社製) を用いて行なった。得られた形質転換体をSOC培地に懸濁したのち、 $100 \mu\text{g/ml}$ アンピシリン含有寒天培地上に蒔いて、 37°C 一晚培養した。その結果、形質転換大腸菌約 $10^5 \sim 10^6$ 個のライブラリーが得られた。

(7) cDNAクローンの5' 端塩基配列解析

寒天培地上に生成したコロニーを拾い、 $100 \mu\text{g/ml}$ アンピシリン含有LB培地に懸濁し、 37°C 一晚培養した。培養液から菌体を遠心分離した後、アルカリ/SDS法によりプラスミドDNAを単離・精製した。このプラスミドを鋳型にして、キット (BigDye Terminator v3.0、ABI社製) を用いてサイクルシーケンシング反応を行ない、蛍光DNAシーケンサー (ABI社製) によりcDNAの5' 端塩基配列を決定した。

【0054】

キャップアナログとして $m^7\text{G}(5')\text{pppG}(5)$ を用いて作製したモデルmRNAを鋳型にした場合、cDNAインサートを有する20クローン中、キャップ連続cDNAを含むものは15個であった。その中の12クローンは、モデルmRNAには無い「G」が、また1クローンは「TG」が、転写開始点のGの前に余分に付加していた。他に、余分な「G」を含まないものが2個、mRNAの途中から始まるキャップ非連続cDNAが5個含まれていた。なお、脱キャップ反応を行なわなくとも、生成する形質転換体の数、キャップ部位から始まるcDNAの割合、余分な「G」の付加等は変わらなかった。

【0055】

一方、キャップアナログとして $\text{A}(5')\text{pppG}(5)$ を用いて作製したモデルmRNAを鋳型にした場合、cDNAインサートを有する24クローン中、キャップ連続cDNAを含むものは18個であった。その中の15クローンは、モデルmRNAには無い「A」が、また1クローンは「TA」が、転写開始点のGの前に余分に付加していた。他に、余分な「A」を含まないものが2個、mRNAの途中から始まるキャップ非連続cDNAが6個含まれていた。

【0056】

またいずれの場合にも、キャップ非連続cDNAを有するクローンでは、モデルmRNAには本来無い余分な「G」や「A」が付加した物は見出せなかった。

【0057】

さらに、キャップ構造を持たないモデルmRNAを鋳型として用いた場合には、cDNAインサートを有する19クローン中、転写開始点からの配列を含むものは16個であった。その中の14クローンは、転写開始点のGの前に余分な配列を持たなかった。しかし、2クローンはモデルmRNAには無い「T」が余分に転写開始点のGの前に付加していた。他に、mRNAの途中から始まるキャップ非連続cDNAが3個含まれていた。

【0058】

以上の結果から、この発明の方法によって、第一鎖cDNA合成の際にその鋳型となるmRNAのキャップ構造塩基「G」に相補的なヌクレオチド「C」が付加され、第二鎖cDNA合成の際に第一鎖cDNA3'端の「C」に相補的な「G」が付加されることが示された。さらに、相補的な「G」の後に、Tが付加される場合も認められた。従って、cDNAの5'端に「G」あるいは「TG」が付加している場合には、キャップ連続cDNAであることが示唆された。

(8) 突出末端ベクタープライマーを用いたcDNA合成

第一鎖cDNAを合成後、EcoRIあるいはXcmIでベクタープライマーを切断し、5'突出末端や3'G突出末端を生成した後、セルフライゲーション反応を行なったところ、平滑末端EcoRVを有するベクタープライマーを用いた場合と同様に5'端に「G」が付加したキャップ連続cDNAクローンが得られた。従って、pKA1ベクタープライマーの制限酵素切断末端は、平滑末端だけでなく、図2に示すように5'突出末端や3'G突出末端でも良いことが示された。

実施例2：培養細胞HT-1080由来のmRNAを用いたcDNAライブラリー作製

ヒトフィブロサルコーマ細胞株HT-1080（大日本製薬から購入）からAGPC法（ニッポンジーン社製キット）を用いて、全RNAを調製した。これをビオチン化オリゴ(dT)プライマー（プロメガ社製）に結合させ、Streptavidin MagneSphere Particlesを加えた後マグネットにかけて、ポリ(A)+RNAを精製した。ポリ(A)+RNA 0.3 μ gとpKA1ベクタープライマー0.3 μ gを用いて、実施例1と同じ条件でcDNA

を合成し、大腸菌の形質転換を行ない、cDNAライブラリーを作製した。その結果、約 10^5 から 10^6 の形質転換体を含むライブラリーが得られた。脱キャップ反応を行なった場合と、行なわなかった場合の両方でライブラリーを作製したが、両者のライブラリーの解析結果に大きな差異は無かったので、以下に脱キャップ反応無しの結果についてのみ記載する。

【0059】

上記ライブラリーから無作為にコロニーを選択し、プラスミドを単離した後、cDNAの5' 端の塩基配列を決定した。cDNAインサートを有するもので、その配列が決定できたもの191クローンについて、GenBankの核酸データベースを用いてBLAST検索を行なったところ、189クローンがmRNA由来の遺伝子として登録されていた。全体の94%に当たる178クローンは、すべて翻訳領域を含んでいた。含量がもっとも多いのが、リボソーム蛋白質P1と延長因子1- α であり、それぞれ5クローンづつ含まれていた。5' 端の塩基配列は、5クローンすべてが、リボソーム蛋白質P1は5'-GCCCTTTCCTCAGCTGCCGC...、延長因子1- α は5'-GCTTTTTCGCAACGGGTTTG...であり、いずれも5' 端の「G」以外は、従来方法（DNA-RNAキメラオリゴキャッピング法）で作製されたライブラリーから得られたもの（非特許文献6）と同じ配列を有していた。ゲノム配列と比較してみると、5' 端にあるいずれの「G」も、ゲノム配列には存在しておらず、cDNA合成の過程で付加したものであることが確認された。このことを裏付けるものとして、翻訳領域を含んでいる178クローン中、168クローンが「G」から始まるものであった。他に、TnG (n=1-8)から始まるものが6個あった。これらは、「G」が付加した後、さらに「T」が複数個付加したものと考えられる。

【0060】

mRNA由来の遺伝子として未登録のものも2クローン含まれていたが、ゲノム配列の一部と完全に一致し、かつESTデータベースの中に同じ配列を有するものが少数存在していた。いずれもゲノムの配列には存在しない「G」が付加した配列であった。したがって、この2クローンはまだ遺伝子として未同定の新規完全長cDNAである可能性が高い。

【0061】

mRNAの途中から始まるもの（キャップ非連続cDNA）が、11クローン含まれていた。これらのcDNAクローンの5'端配列が「G」から始まるものも3クローン含まれていたが、いずれも本来のmRNAの配列に由来するものであり、新たに付加した「G」を有するものは無かった。

【0062】

以上の結果から、全体としてみると、cDNAインサートを有する191クローンの中で、完全長（キャップ連続cDNA）であると思われるものが180クローン含まれていることから、完全長率は94%という値になる。また、5'端配列が「G」から始まる171クローンの中で、キャップ非連続cDNAは3クローンであったことから、このcDNAライブラリーの場合、5'端配列が「G」で始まるものでかつ翻訳領域を含んでいるものは、完全長cDNAであることが98%の確率で保証されていると言える。特に、ゲノムの配列には存在しない「G」から始まるものは、ほぼ間違いなく完全長cDNAであることが保証される。

実施例3：培養細胞HT-1080由来の全RNAを用いたcDNAライブラリー作製

ヒトフィブロサルコーマ細胞株HT-1080から実施例2で調製した全RNA 5 μ gとpKA1ベクタープライマー0.3 μ gを用いて、実施例1と同じ条件（ただし、脱キャップ反応は省略）でcDNAを合成し、大腸菌の形質転換を行ない、cDNAライブラリーを作製した。その結果、約10⁵の形質転換体を含むライブラリーが得られた。

【0063】

このライブラリーに含まれるcDNAクローンについて、実施例2と同様に5'端の部分塩基配列解析を行なった。cDNAインサートを有するもので、その配列が決定できたもの222クローンについて、GenBankの核酸データベースを用いてBLAST検索を行なったところ、217クローンがmRNA由来の遺伝子として登録されていた。全体の96%に当たる209クローンは、すべて翻訳領域を含んでいた。これらの中で、189クローンは「G」から始まるクローンであった。ここで特筆すべき点は、このライブラリーは、精製したポリ(A)+RNAからではなく、全RNAから作製したという点である。しかも、その量は5 μ gという微量である。したがって、この方法を用いることにより、ポリ(A)+RNAの精製プロセスを省くことができ、かつ数 μ gオーダーの全RNAから高品質の完全長cDNAライブラリーを作製できることが示さ

れた。

実施例 4 : 培養細胞ARPE-19完全長cDNAライブラリーの大規模配列解析

ヒト網膜色素上皮細胞株ARPE-19 (ATCCから分譲) から調製したポリ(A)+RNA 2.5 μ gとpKA1ベクタープライマー0.7 μ gを用いて、実施例 1 と同じ条件でcDNAを合成し、大腸菌の形質転換を行ない、cDNAライブラリーを作製した。このライブラリーに含まれるcDNAクローンについて、実施例 2 と同様に5' 端の部分塩基配列解析を行なった。cDNAインサートを有するもので、その配列が決定できたもの3,683クローンについて、GenBankの核酸データベースを用いてBLAST検索を行なったところ、3,662クローンがmRNA由来の遺伝子として登録されていた。全体の94%に当たる3,474クローンは、完全長cDNAクローンであった。これらの中で、3,069クローンは「G」あるいは「TnG」から始まるクローンであった。

実施例 5 : pGCAP1ベクタープライマーの作製

多機能クロニングベクターpKA1(非特許文献 6)を出発材料にして、pGCAP1を作製した。図 4 Aにその構造の模式図を、配列表の配列番号 1 にその全塩基配列を示す。pKA1との相違点は、(1)複製オリジンをpUC19由来に変えたこと、(2)pKA1の制限酵素部位HindIIIの上流にPacIを追加したこと、(3)pKA1のEcoRI-BstXI-EcoRV-KpnI部位をEcoRI-AflIII-SwaI-KpnIに置換したことである。配列番号 1 の 1 番目ヌクレオチド「A」はHindIII部位に、また568番目がEcoRI部位に対応する。

【 0 0 6 4 】

pGCAP1 100 μ gを200UのKpnIで完全消化後、0.8%アガロース電気泳動にかけ、切断片を単離精製した。得られた切断片70 μ gを20 μ M dTTP存在下、375Uの末端転移酵素(宝酒造社製)を添加し、37℃30分間反応させ、KpnI消化によって生成した3' 突出末端に約60個のdTテールを付加した。次いで反応生成物をSwaIで消化し、0.8%アガロース電気泳動にかけ、長い方の切断片を単離精製した。これをpGCAP1ベクタープライマー(図 4 B)として用いた。

実施例 6 : pGCAP1ベクタープライマーを用いたcDNAライブラリー作製

ヒトフィブロサルコーマ細胞株HT-1080の全RNA 5 μ gと実施例 5 で調製したpGCAP1ベクタープライマー0.3 μ gを用いて、実施例 3 と同じ条件でcDNAを合成し、大腸菌の形質転換を行ない、cDNAライブラリーを作製した。その結果、約 2×10^5

の形質転換体を含むライブラリーが得られた。このライブラリーに含まれるcDNAクローンについて、5'端の部分塩基配列解析を行なったところ、5'端に「G」が付加した完全長cDNAが得られ、実施例3と同様に完全長率は95%であった。

【0065】

pKA1ベクタープライマーを用いた場合、EcoRV切断末端(…GAT)にGが一個付加すると…GATG…となり開始コドンATGが新たに生成する。このことは、キャップ連続cDNAの配列を知ることが目的の場合は問題にならないが、このベクターを発現ベクターとして用いようとする場合は、余分なATGの存在はcDNAの正確な転写・翻訳に悪影響を及ぼす可能性がある。pGCAP1ベクタープライマーを用いると、SwaI切断末端(…ATTT)にGが一個付加すると…ATTTG…となり開始コドンは生成しないので、この問題は生じない。

【0066】

さらに、第一鎖cDNAを合成後、AflIIIでベクタープライマーを切断し、5'突出末端を生成した後、セルフライゲーション反応を行なったところ、平滑末端SwaIを有するベクタープライマーを用いた場合と同様に5'端に「G」が付加したキャップ連続cDNAクローンが得られた。AflIII切断末端(…CTTAA)にGが一個付加すると…CTTAAG…となり、AflIII切断部位の再形成が起こる。したがって、キャップ連続cDNAクローンは、AflIIIによって切断可能となる。このことを利用すれば、AflIII消化によってキャップ連続cDNAクローンかどうかを判定することもできる。

【0067】

【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、少ない工程で、転写開始点ヌクレオチドからの連続配列を有する完全長cDNAを効率的に合成することが可能となる。これによって遺伝子がコードしている蛋白質の一次構造に関する情報と、遺伝子の発現を調節している発現制御領域に関する情報を確実に得ることが可能となり、ゲノム情報を有効に活用できるばかりか、医療分野等における有用蛋白質の遺伝子工学的製造にも大きく貢献する。

【0068】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> President of National Rehabilitation Center for the Disabled
Hitachi Instruments Service Co., Lt.
KATO, Seishi

<120> Method for synthesizing cDNA

<130> NP03032-YS

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 3347

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Modified from expression vector pKA1

<220>

<221> misc_feature

<223> Circular polynucleotide

<400> 1

aagcttggtgt gtggaatgtg tgtcagtttag ggtgtggaaa gtccccaggc tccccagcag 60

gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac caggtgtgga aagtccccag 120
gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca tgcattctaa ttagtcagca accatagtcc 180
cgccccctaac tccgccccatc ccgccccctaa ctccgcccag ttccgccccat tctccgcccc 240
atggctgact aatTTTTTTTT atttatgcag aggccgaggc cgcctcggcc tctgagctat 300
tccagaagta gtgaggaggc ttttttggag gcctaggctt ttgcaaaaag ctcctcgagg 360
aactgaaaaa ccagaaagtt aactggtaag ttttagtcttt ttgtctttta tttcaggtcc 420
cggatccggt ggtggtgcaa atcaaagaac tgctcctcag tggatgttgc ctttacttct 480
aggcctgtac ggaagtgtta cttctgtctt aaaagctgct cgagtgtaaa acgacggcca 540
gtacgtatTTT aatacgactc actataggga attccttaag atttaaagt ggtaccgcgg 600
ccgcggatct cccttttagtg agggTTaatt ggatccagac atgataagat acattgatga 660
gtttggacaa accacaacta gaatgcagtg aaaaaaatgc tttatttTtg aaatttTtga 720
tgctattgct ttatttTtaa ccattataag ctgcaataaa caagttaaca acaacaattg 780
cattcatttt atgtttcagg ttcaggggga ggtgtgggag gttttttctg cattaatgaa 840
tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg ctcttccgct tcctcgctca 900
ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggT atcagctcac tcaaaggcgg 960
taatacggtt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc 1020
agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgTtgctggc gtttttccat aggctccgcc 1080
cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgt caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac 1140
tataaagata ccaggcgTtt ccccttgga gtcctctgt gcgctctcct gttccgaccc 1200
tgccgcttac cggatactg tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata 1260
gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgTtcg ctccaagctg ggctgtgtgc 1320
acgaaccccc cgTtcagccc gaccgctgcg ctttatccgg taactatcgT cttgagtcca 1380
acccggtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag 1440
cgaggTatgt aggcggTgct acagagTtct tgaagtggTg gcctaactac ggctacacta 1500
gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagTtg 1560
gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggTTTTTTT gtttgcaagc 1620
agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggT 1680
ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggtttt ggtcatgaga ttatcaaaaa 1740
ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagTtt taaatcaatc taaagtatat 1800

atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga 1860
tctgtctatt tcgttcatcc atagtigcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac 1920
gggagggcctt accatctggc cccagtgtg caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg 1980
ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtggctcctg 2040
caactttatc cgcctccatc cagtctatta attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt 2100
cgccagttaa tagtttgccg aacgttggtt ccattgctac aggcatcgtg gtgtcacgct 2160
cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat 2220
cccccatggt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcgggtcc tccgatcgtt gtcagaagta 2280
agttggccgc agtgttatca ctcatggtta tggcagcact gcataattct cttactgtca 2340
tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat 2400
agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac 2460
atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa 2520
ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac tcgtgcaccc aactgatctt 2580
cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg 2640
caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat 2700
attattgaag catttatcag gggtattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt 2760
agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg aaaagtcca cctgaaattg 2820
taaacgttaa tattttggtt aaattcgcgt taaatttttg ttaaatacag tcatttttta 2880
accaataggc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa agaatagacc gagatagggt 2940
tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac tccaacgtca 3000
aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg tgaaccatca ccctaataca 3060
gttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcgga ccctaaaggg agccccgat 3120
ttagagcttg acggggaaag ccggcgaacg tggcgagaaa ggaagggaag aaagcgaaag 3180
gagcgggcgc tagggcgctg gcaagtgtag cggtcacgct gcgcgtaacc accacacccg 3240
ccgcgcttaa tgcccgcta cagggcgcgt cccattcgcc attcacacag gaaacagcta 3300
tgacatgat cctctagagt cgacctgcag gcatgcttaa ttaaggg 3347

【図面の簡単な説明】

【図 1】

この発明の基本原理を示した模式図である。

【図 2】

この発明の方法における mRNA/cDNA ヘテロデュプレックスへのリンカーの結合様式を例示した模式図である。

【図 3】

この発明の方法におけるベクタープライマーを使用した場合の結合様式を例示した模式図である。

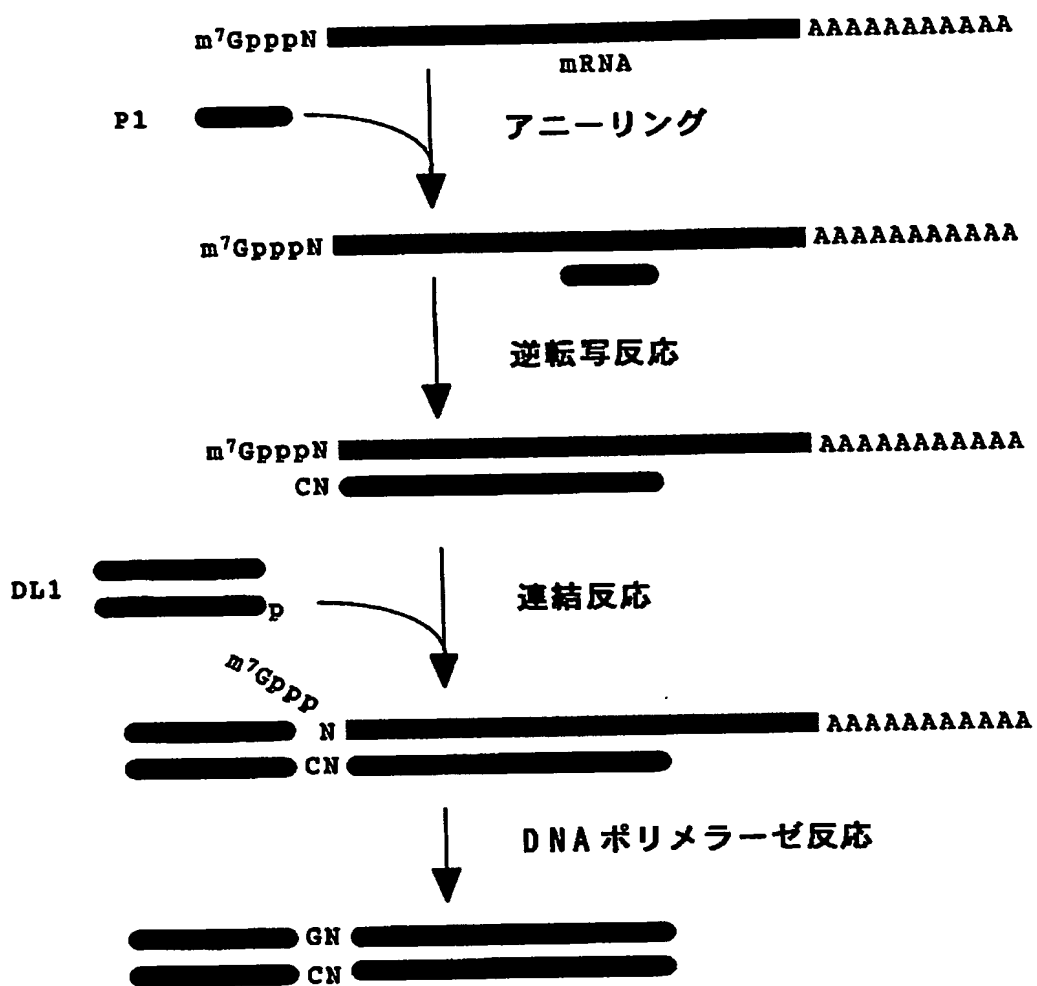
【図 4】

この発明の方法における pGCAP1 並びに pGCAP1 ベクタープライマーの構造を例示した模式図である。

【書類名】

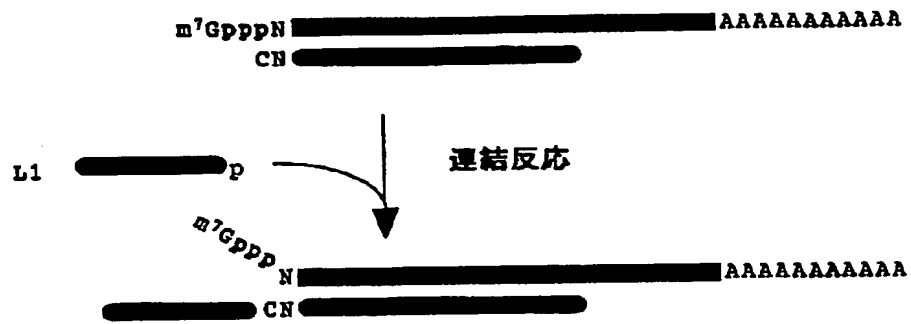
図面

【図 1】

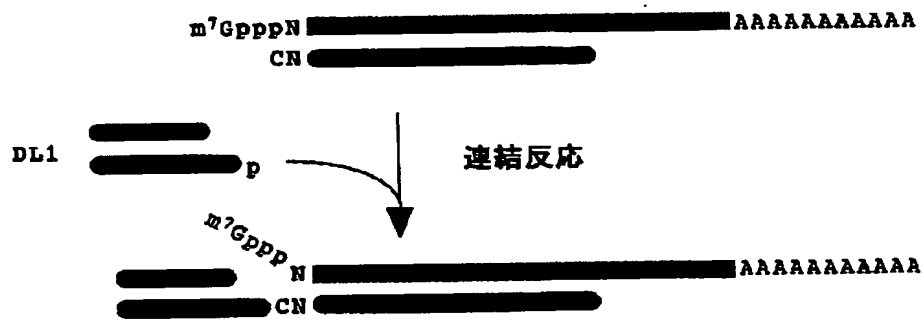


【図 2】

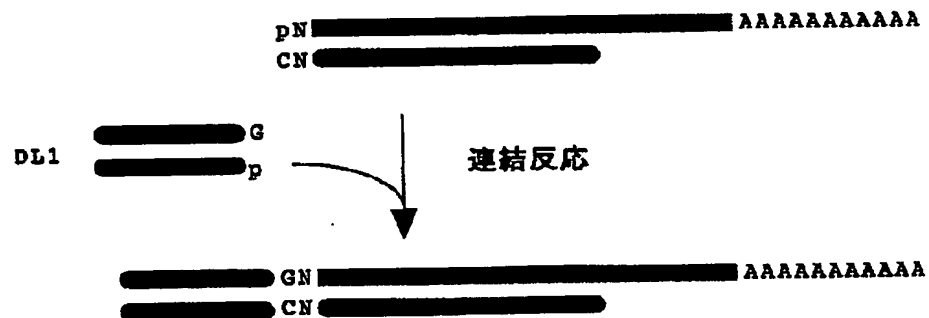
(A)



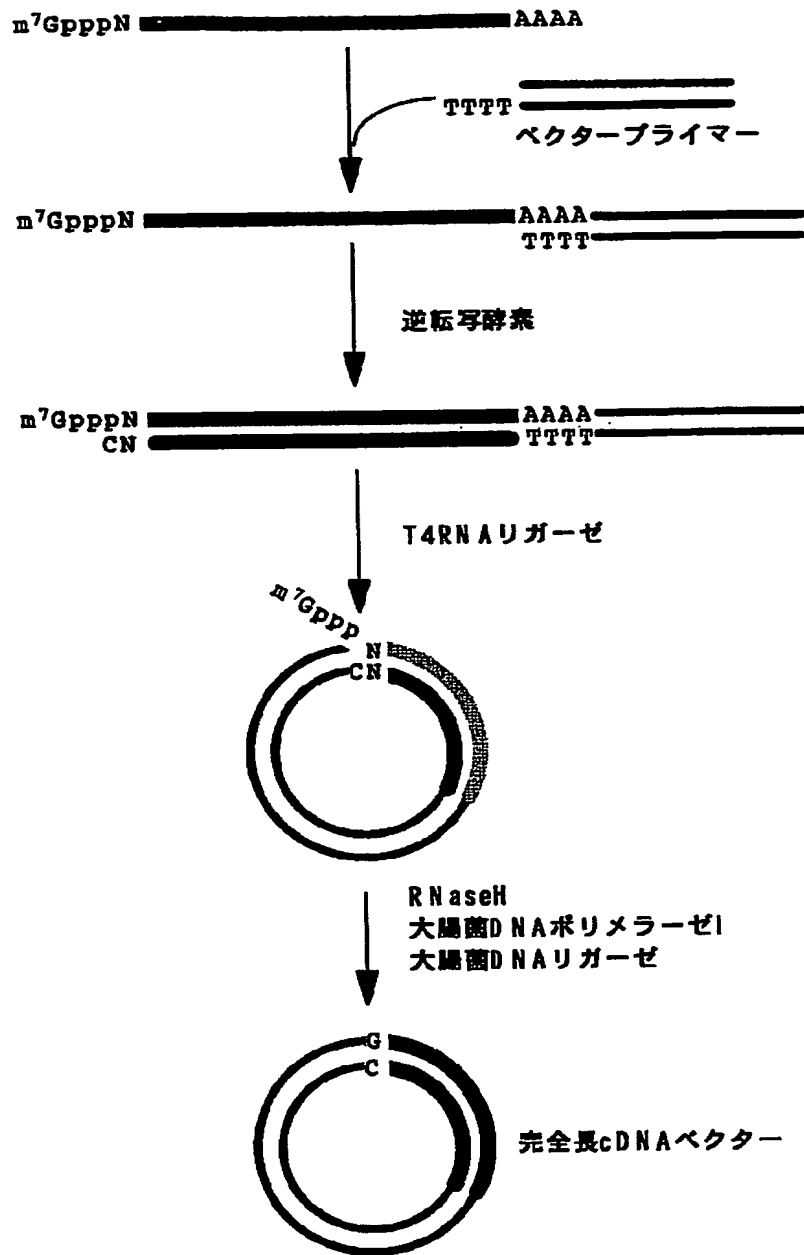
(B)



(C)

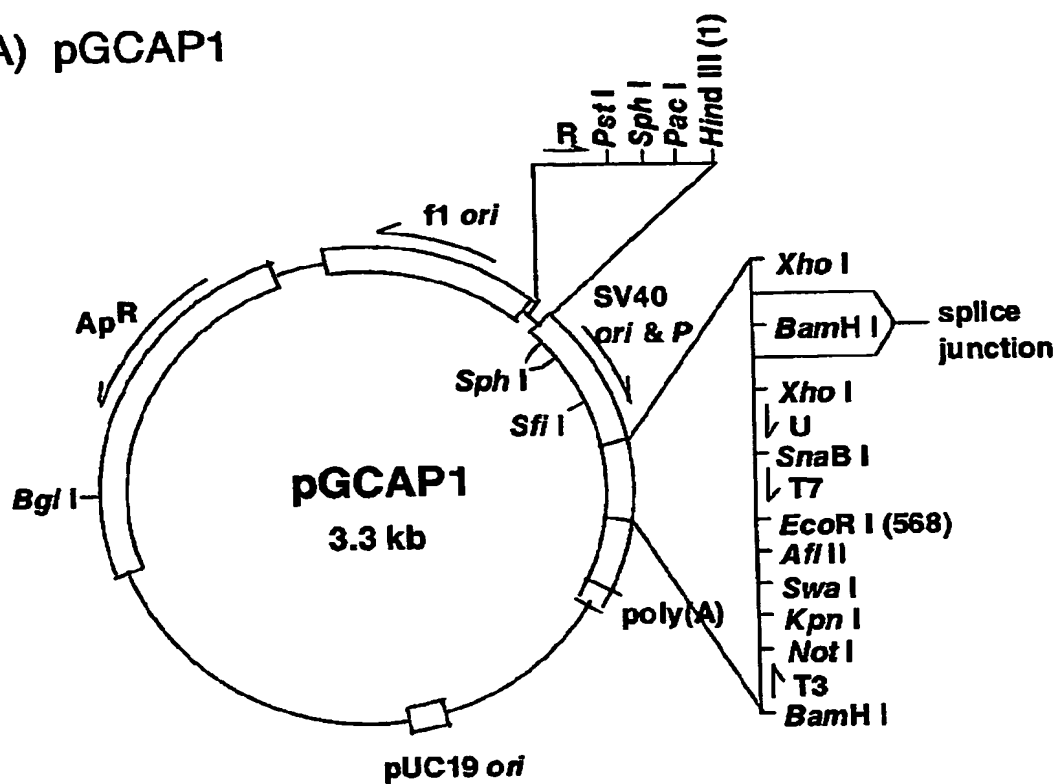


【図 3】

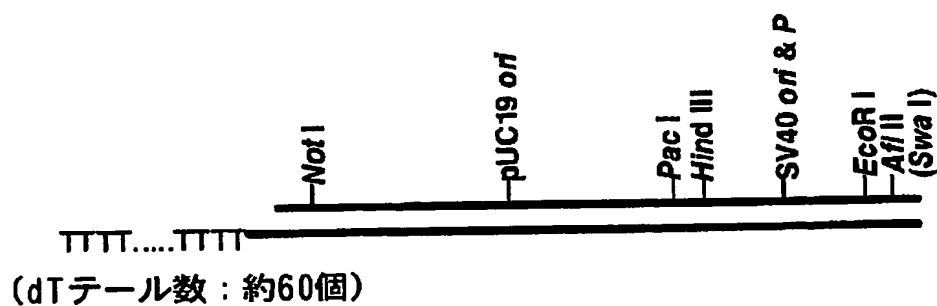


【図4】

(A) pGCAP1



(B) pGCAP1ベクタープライマー



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 少ない工程で、転写開始点ヌクレオチドからの連続配列を有する完全長cDNAを効率的に合成する方法を提供する。

【解決手段】 mRNAのキャップ構造に隣接するヌクレオチドからの連続配列を有するcDNAを合成する方法であって、(i)キャップ構造を有するmRNAを含むRNA混合物に、プライマーオリゴヌクレオチド(P1)をアニールする工程、(ii)プライマーオリゴヌクレオチド(P1)から逆転写酵素により第一鎖cDNAを合成してmRNA/cDNAヘテロデュプレックスを調製する工程、および(iii)mRNA/cDNAヘテロデュプレックスのcDNAの3'端側に、リガーゼを用いてリンカーヌクレオチド(L1)を連結する工程、を含む。

【選択図】 図1

特願 2003-091373

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[391034994]

1. 変更年月日
[変更理由]

住 所
氏 名

1991年 4月17日
新規登録
埼玉県所沢市並木4丁目1番地
国立身体障害者リハビリテーションセンター総長

特願 2003-091373

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[300050367]

1. 変更年月日

2000年 6月20日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都新宿区四谷4丁目28番8号

氏 名

日立計測器サービス株式会社

特願 2 0 0 3 - 0 9 1 3 7 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 9 7 1 1 5 3 5 8]

1. 変更年月日
[変更理由]

住 所
氏 名

1 9 9 7 年 7 月 3 1 日
新規登録
神奈川県相模原市若松 3 - 4 6 - 5 0
加藤 誠志

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:



BLACK BORDERS

- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.